Aus dem Hygienischen Institut der Universität Berlin
Direktor: Professor Dr. Zeiss

Über den Verwendungsstoffwechsel anaerober Bacillen

(Tetanus, Botulinus, Gasbrand und Pararauschbrand)

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung der medizinischen Doktorwürde
an der Friedrich-Wilhelms-Universität zu Berlin

vorgelegt von

Erwin Höer

aus Saarbrücken

Tag der Promotion: 25. November 1938

Druck: Buchdruckerei Hanns Michel, Berlin NW 7, Marienstraße 11

M 352

Gedruckt mit Genehmigung
der
Medizinischen Fakultät der Universität Berlin

*

Dekan: Prof. Dr. Siebeck
Referent: Prof. Dr. Ehrismann
Korreferent: Prof. Dr. Zeiss

R. UNIV.
BIBLIOTHEEK
LEIDEN

Bei meinen Versuchen über den Verwendungsstoffwechsel einiger pathogener Anaerobier habe ich mich im wesentlichen auf die Ausführungen von H. Braun gestützt, der in seinemReferat „Zur Assimilation und Dissimilation bei Bakterien" die hauptsächlichen Leit- und Grundsätze angegeben hat, die zu genauen Arbeiten über den Verwendungsstoffwechsel von Bakterien notwendig sind.

Es ist bei diesen Untersuchungen immer das Bestreben, Bakterien in vollkommen definierten Nährlösungen zu züchten. Denn nur dann ist über die unbedingte Notwendigkeit oder Entbehrlichkeit eines Nährstoffes ein bestimmtes Urteil abzugeben. Sind auch nur kleinste Mengen von Substanzen vorhanden, deren chemische Zusammensetzung nicht genau bekannt ist, so besteht die Möglichkeit, daß gerade diese geringen Spuren unbekannter Substanzen das Wachstum ermöglichen oder eine Förderung bewirken. Natürlich ist damit nicht gesagt, daß es möglich ist, in diesen vollkommen definierten Nährböden alle Bakterienarten zu züchten. Falls ein Wachstum zu erzielen ist, so ist damit auch noch nicht bewiesen, daß sie unter normalen Bedingungen, also in ihrer Eigenschaft als Krankheitserreger diese Ernährungsmöglichkeit bevorzugen. Es besteht die Möglichkeit, Bedingungen zu erforschen, unter denen ein Wachstum vollkommen ausgeschlossen erscheint, also Stoffe zu finden, ohne die ein Wachstum unmöglich ist. Auch hier muß man die Ergebnisse mit Vorsicht bewerten, da es anspruchsvolle und anspruchslose Stämme gibt, und man bei Untersuchungen eines anderen Stammes desselben Erregers immer wieder Ueberraschungen erlebt, und ein Wachstum erzielt in Lösungen, in denen der vorhergehende Stamm nicht das geringste Wachstum zeitigte. Bei der Züchtung pathogener Bakterien ist noch eine zweite Tatsache von Wichtigkeit; die Erhaltung ihrer Eigenart als Krankheitserreger, d. h. ihre Fähigkeit Gifte zu bilden. Wie H. Gins bemerkt, ist man nur selten imstande, eine Bakterienart über eine längere Passagenreihe zu züchten, ohne daß ihre pathogenen und antigenen Eigenschaften verloren gehen. Die Gefahr, diese Eigenschaften zu verlieren, ist natürlich noch viel größer in Nährmedien, in denen der Mikroorganismus so wie so nur ein kümmerliches Auskommen findet.

Bei meinen Versuchen kam es mir vor allen Dingen darauf an, die Ausnutzbarkeit einzelner Aminosäuren zum Protoplasmaaufbau zu prüfen. Die Kohlenstoffquelle blieb daher immer dieselbe. Den Zusatz von Mineralien veränderte ich, um bei Ausbleiben des Wachstums dasselbe eventuell dadurch zu erzielen oder bei schwachem Wachstum dieses zu verbessern.

In der Literatur finden wir zahlreiche positive Züchtungsversuche in synthetischen Nährmedien mit Bakterien der Typhusgruppe, Choleravibrionen und Diphtheriebakterien. Ueber die Assimilationsfähigkeit von obligaten Anaerobiern liegen die Dinge noch weniger erforscht. H. Zeissler hat die Ausnutzbarkeit der verschiedenen Kohlehydrate durch Anaerobier untersucht. Zwei Engländer, Knight und Fildes, haben den Bac. sporogenes in einer synthetischen Nährlösung gezüchtet und die Notwendigkeit bzw. Entbehrlichkeit der einzelnen Aminosäuren bestimmt. Bei letzteren Versuchen ist aber eine Bedingung, von der ich am Anfang sprach, nicht erfüllt. Es handelt sich hier nicht um ein Nährmedium, dessen chemische Zusammensetzung genau bekannt ist. Eine entscheidende Rolle spielt hier ein sogenanntes „sporogenes Vitamin". Doch mache ich zu dieser Arbeit später noch genauere Ausführungen. Es ist somit nach der Arbeit von Knight und Fildes kein absolut eindeutiges Urteil über die assimilatorischen Fähigkeiten des Bac. sporogenes abzugeben.

Da die Züchtung der Anaerobier in synthetischen Lösungen auf Schwierigkeiten stößt, muß versucht werden, alle Bedingungen so günstig wie möglich für ein Wachstum zu gestalten. Es erscheint mir deshalb notwendig, diejenigen Tatsachen näher zu erläutern, deren Kenntnis ausschlaggebend bei der Zusammensetzung und Modifizierung der einzelnen Nährlösungen für mich war. Ich griff auf Medien zurück, die zum Teil mit Erfolg von verschiedenen Autoren bei der Züchtung anderer Bakterien angewandt worden waren.

Braun gelang es z. B., Coli, Paratyphus B Bakterien und die anspruchslosen Stämme von Typhus in einer Nährlösung mit Ammoniumchlorid als einziger Stickstoffquelle und Natriumlaktat als einziger Kohlenstoff- und Energiequelle zu züchten. Aber dabei wurde ein besonders großer Sauerstofbedarf festgestellt. Auf diese Tatsache macht besonders J. v. Vasarheyli aufmerksam, auch betont er, daß ein anaerobes Wachstum anspruchsloser Typhusstämme nicht möglich ist bei Ammoniumchlorid als einziger Stick-

stoffquelle. Da der Luftsauerstoff als Energiequelle bei der Züchtung von Anaerobiern nicht in Frage kommt, erscheint es mir von vornherein unwahrscheinlich ohne organische Stickstoffquelle auszukommen. Als besonders geeignet fand Braun asparaginsaures und glutaminsaures Natrium. Es bestünde die Möglichkeit, das asparaginsaure Natrium auch als Kohlenstoffquelle auszuwerten. Versuche von I. Hirsch haben aber gezeigt, daß Choleravibrionen anaerobes Wachstum nur bei Anwesenheit von Kohlehydraten zeigten. Er hält die anoxybiotische Spaltung der Kohlehydrate für eine unbedingte Notwendigkeit bei der Anaerobiose. Als besonders günstig ist der Traubenzucker bekannt. Doch machen Ucke und v. Hibler darauf aufmerksam, daß wahrscheinlich durch die Säurebildung aus dem Traubenzucker die Sporenbildung leidet. Ebenso bemerken sie ausdrücklich, daß bei Traubenzuckerzusatz leichter Degenerationsformen auftreten. Ich erwähne dies ausdrücklich, da ich — wie später beschrieben — ähnliche Beobachtungen machte. Es kam mir aber vorerst darauf an, überhaupt ein Wachstum zu erzielen, sodaß diese Tatsachen vorläufig keine Rolle spielen.

Bei Untersuchungen des Mineralstoffwechsels wurde gezeigt, daß zahlreiche Elemente entbehrlich sind, oder wenigstens die Spuren genügen, die ohne weiteres durch Verunreinigung in den aus dem Handel bezogenen Substanzen der Nährmedien vorhanden sind. Bei der Züchtung von Typhus, Parathyphus Coli und Ruhrbakterien fand Braun üppigstes Wachstum bei gleichzeitiger Anwesenheit der Elemente Kalium, Natrium, Magnesium und Schwefel. Diese Elemente berücksichtige ich vorerst in meinen Nährlösungen.

Besondere Beachtung für die Züchtung in synthetischen Nährlösungen verdient noch die Wasserstoffionenkonzentration. Es ist zwar bekannt, daß die Bakterien in einer gebräuchlichen Nährbouillon sich innerhalb einer ziemlich großen Spanne des PH-Wertes vermehren können; in synthetischen Nährmedien ist diese Fähigkeit weitgehend eingeschränkt. Um nun eine einigermaßen konstante Wasserstoffzahl zu gewährleisten, benutzte ich einen Phosphatpuffer, der nach Braun zur Untersuchung des Verwendungsstoffwechsels bei anderen Bakterien genügte. Der PH-Wert einer Mischung von gleichen Mengen primären Kaliumphosphats und sekundärem Natriumphosphats ist etwa PH-7. (Michaelis, L.). Bei der später zu beschreibenden Nährlösung dürfen wir annehmen, daß dieser Wert nicht allzu sehr gestört ist. Es besteht nun die Möglichkeit, durch Zugabe von geringen Mengen Natronlauge den PH-Wert auf

7,6 zu erhöhen, der etwa das Optimum für ein Wachstum darstellt. Eine Pufferung ist in den von mir angewandten Nährmedien besonders wichtig, da bei der Umsetzung des Traubenzuckers die H-Ionenkonzentration stark zunimmt. Dies kann so weit führen, daß die natürlichen Puffer des Bakterienprotoplasmas nicht mehr imstande sind, die im Zellinnern bestehende konstante Wasserstoffzahl zu erhalten. So zeigten Untersuchungen von Hahn und Hirsch mit Choleravibrionen, daß ein Absterben der Kulturen bewirkt wurde durch den Abbau von Traubenzucker und die dadurch eintretende Säuerung des Nährmediums; bei sehr starkem Wachstum ist diese Gefahr noch wesentlich vergrößert.

Aus diesen Tatsachen ergeben sich noch Schlüsse für den Zeitpunkt der Ueberimpfung der einzelnen Passagen auf die nächstfolgenden; hierauf komme ich noch später bei der Beschreibung der Ueberimpftechnik zurück. Einen bestimmten PH-Wert im Kulturmedium aufrecht zu erhalten ist natürlich sehr erstrebenswert, da dies wichtig ist für die Aufrechterhaltung des Gleichgewichtes, bestehend zwiy'en den Oxydations- und Reduktionsvorgängen des Nährmediums und denen des Mikroorganismus. Mit der Aenderung der Wasserstoffionenkonzentration wird nämlich auch dieses Gleichgewicht verändert, was für das Bakterienwachstum aber keineswegs gleichgültig ist.

Damit komme ich zu einem Faktor, der in der Literatur allgemein als wichtig für den Stoffwechsel der Bakterien anerkannt worden ist, dem Oxydations-Reduktionspotential. Dieses ist besonders für die Anaerobiose von ungeheurer, wenn nicht ausschlaggebender Bedeutung. Während bei der Aerobiose Oxydationen durch Sauerstoff eine bedeutende Energiequelle darstellen, dürfte wohl bei der Anaerobiose der ganze Energievorrat in der Spannung zwischen oxydationsfähigen und reduktionsfähigen Molekülen zu suchen sein. Es ist nicht meine Aufgabe, dies näher auszuführen, doch glaube ich einige diesbezügliche Versuche hier erwähnen zu müssen, da sie mir für die spätere Auswertung meiner eigenen Versuche wichtig erscheinen. Durch Versuche von Aubel, Aubertin und Genevois wurden Grenzwerte des Potentials festgestellt, bei denen ein Wachstum möglich ist. Der obere Grenzwert für strenge Anaerobiose beträgt —0,060 Volt bei PH-7. Dies entspricht einem Farbstoffumschlag von grün nach rosa des Janusgrüns. Dieser Umschlag tritt ein bei Zusatz reduzierender Substanzen wie Thioglykolsäure, Cystein und Natriumsulfid. So zeigten z. B. Hosoya

und Kishino, daß Bac. botulinus und tetani nur wachsen können, wenn der Nährlösung Cystein oder Natriumsulfid zugegeben waren. Die Fähigkeit der Anaerobier in Nährmedien bei Luftzutritt zu wachsen besteht also darin, daß durch den Zusatz von Substanzen, die die SH-Gruppe enthalten, das nötige Oxydations-Reduktionspotential hergestellt wird. — Dieselbe Ansicht vertreten Quastel und Stephenson, während Mc. Leod und Gordon annahmen, daß die Anwesenheit von Sauerstoff das Wachstum der Anaerobier — wohl infolge von Bildung des giftigen H_2O_2 — hemmte. — Damit ist noch nichts über das Optimum des Potentials gesagt, und es ist durchaus möglich, daß bei Erreichen dieses Optimums die nötige Energie vorhanden ist, Stoffe zum Aufbau des Bakterienprotoplasmas zu verwerten, deren Ausnutzung unter schlechten Bedingungen, d. h. unter ungünstigem Reduktions-Oxydationspotential, ausgeschlossen ist. Hierher gehören die Untersuchungen von Stickland. Er untersuchte an Hand von Farbreaktionen die reduzierende bzw. oxydierende Wirkung einer Bakterienaufschwemmung des Bac. sporogenes auf einige Aminosäuren. D. h. also, bei Anwesenheit der Bakterienaufschwemmung traten einige der Aminosäuren als Wasserstoffdonatoren und einige als Wasserstoffakzeptoren auf. Und zwar als Wasserstoffdonatoren: Alanin, Valin und Leucin; als Wasserstoffakzeptoren: Prolin, Oxyprolin und Glykokoll. Er hält es für unvorstellbar, daß eine einzige Aminosäure unter anaeroben Bedingungen gespalten werde, sondern für viel wahrscheinlicher, daß die Reaktion zwischen zwei Molekülen verschiedener Aminosäuren stattfindet. Bei Serin fand er, daß es sowohl als Wasserstoffakzeptor wie auch als Wasserstoffdonator auftreten könne.

Aehnliche Aminosäuren verwandte Burrows in einer Nährlösung zur Züchtung des Bac. botulinus. Die Lösung enthielt: Glycin, d Alanin, l Leucin, l Prolin, d Lysin, l Cystin und Tryptophan. Dieser Autor glaubt, daß diese Bausteine notwendig sind, weil sie nicht vom Bakterium synthetisiert werden können. Stickland glaubt, daß unkompliziert gebaute Aminosäuren leicht vom Bakterium aufgebaut werden können, daß sie aber als Energiespender dienen müßten. Es ist nicht anzunehmen, daß zur Erzeugung von Energie bei der Anaerobiose nur die Spannung zwischen wasserstoffspendenden und wasserstoffakzeptierenden Aminosäuren dienen kann, oder gar, daß dies die einzig mögliche Energiequelle darstellt. So zeigt z. B. eine neuere Arbeit von P. Fildes und G.M. Richardson, daß zum Wachs-

tum von Bac. sporogenes gerade die von Stickland zur Energieerzeugung als notwendig bezeichneten Aminosäuren entbehrlich sind. Hier muß also schon ein anderer Faktor als Energiequelle in Betracht gezogen werden, d. h., daß hier andere Donatoren und Akzeptoren wirksam sein müssen. Ferner kommt als Energiequelle noch die glykolytische Spaltung der Kohlehydrate in Betracht. So fand z. B. I. Hirsch, daß der Choleravibrio unter anaeroben Verhältnissen zu wachsen nur imstande war bei Anwesenheit von Kohlehydraten und deren anoxybiotischen Spaltung, während Stickland die Kohlehydrate — wohl infolge der PH Verschiebung bei ihrem Abbau — nicht zweckmäßig für anaerobes Wachstum hält.

Aus diesen Untersuchungen gehen auf jeden Fall zwei Tatsachen hervor, die den Erfolg einer synthetischen Nährlösung bedingen.

1. Es muß das nötige und zwar möglichst günstige Oxydations-Reduktionspotential in dem Nährmedium herrschen.
2. Es müssen Baustoffe vorhanden sein, die unbedingt notwendig sind und die der betreffende Mikroorganismus unmöglich aus niederen Baustoffen synthetisieren kann.

Daß diese Bedingungen für die einzelnen pathogenen Anaerobier z. T. übereinstimmen, z. T. verschieden sein können, ist wohl selbstverständlich.

Einige Aminosäuren erscheinen besonders wertvoll. Ich erwähnte am Anfang, daß H. Braun asparaginsaures und glutaminsaures Natrium als besonders günstige Stickstoffquelle bezeichnet. Ferner scheint Tryptophan ein besonders wichtiger Baustein zu sein. Hierzu erwähne ich eine Arbeit von E. Zdansky, der mit Bact. coli und Choleravibrio Versuche anstellte. Er züchtete diese Mikroorganismen unter gleichen Bedingungen einmal unter Verwendung von Pepton Witte, das andere Mal von Pepton Roche. An Hand der Indolbildung wies er nach, daß das freie Vorhandensein von Tryptophan in Pepton Witte eine frühere Bildung von Indol bedingte als Pepton Roche. Burrows bezeichnet Tryptophan ebenfalls für viele Bakterien als unentbehrlich. Auf die Arbeiten von Knight und Fildes, die genaue Versuche über die Notwendigkeit der verschiedenen Aminosäuren angestellt haben, komme ich später noch zu sprechen.

Eine Beachtung verdient ferner noch der osmotische Druck einer Nährlösung. Obwohl bekannt ist, daß die Zelle bei langsamer Veränderung des osmotischen Druckes im

Stande ist, sich weitgehend anzupassen, durch sogenannte Osmoregulation (A. Fischer), so ist es doch für das Wachstum sicherlich günstig, wenn die osmotischen Verhältnisse der Nährlösung denen des Mikroorganismus angeglichen sind; dies wird durch Zugabe von NaCl erreicht.

Da in der Literatur auch viel die Frage der Notwendigkeit von Vitaminen auch für das Wachstum der Bakterien erörtert wird, möchte ich noch auf das „Sporogenes Vitamin" eingehen, das in den Versuchen von P. Fildes und G. M. Richardson eine wesentliche Rolle spielt.

Sie wiesen die Wichtigkeit dieses „Vitamins" für Bac. sporogenes nach, indem sie auf einem Gelatinenährboden das „Vitamin" dazugaben und es in der Kontrolle wegließen. Dabei erzielten sie ein bedeutend stärkeres Wachstum auf dem Nährboden dem das „Sporogenes Vitamin" zugegeben war. Daß das Wachstum in Kontrollversuchen nicht ganz ausblieb, erklären sie damit, daß geringe Spuren hier ebenfalls vorhanden seien und dieselben nicht zu beseitigen wären ohne wesentliche Stoffe mit zu zerstören. Die Stärke des Wachstums war bis zu einem gewissen Grade von der zugefügten Menge des „Sporogenes Vitamin" abhängig, um dann aber bei immer größeren Gaben keinen weiteren Einfluß mehr auszuüben.

Dieses „Vitamin" kann aus den verschiedensten Quellen hergestellt werden, aus tierischen Geweben und Säften, Hefe und Urin. Da nun bekannt ist, daß einzelne Bakterien ohne jegliches Vitamin in den einfachsten Nährlösungen zu wachsen vermögen, wird die Frage aufgestellt, ob sie ohne ein Vitamin auszukommen vermögen, oder ob sie dasselbe aufzubauen im Stande sind. Die beiden Autoren glauben das letztere.

Es kann hier natürlich die Frage erörtert werden, ob das „Sporogenes Vitamin" in obigen Versuchen wirklich als Vitamin wirkt, d. h. lediglich durch seine Anwesenheit Prozesse ermöglicht, die sonst ausgeschlossen sind, oder aber ob in dieser Substanz regelrechte Bausteine enthalten sind, die ebenfalls nur in geringen Mengen erforderlich sind, um ein Bakterienwachstum zu ermöglichen.

Zum Beweis, daß Bakterien im Stande sind das „Vitamin" aufzubauen, führen die beiden Autoren einen Versuch mit Tb-Bakterien an, die auf einem vitaminfreien Nährboden gezüchtet waren und dann dieser Nährboden als Ausgangsmaterial zur Herstellung des Vitamins diente und dieses mit demselben Erfolg bei der Züchtung des Bac. sporogenes angewandt wurde.

Für Bac. tetani und Bac. Fränkel fanden sie das Vitamin nicht geeignet.

Dieses „Sporogenes Vitamin“ oder eine entsprechende Substanz fanden in meinen Lösungen vorerst keine Berücksichtigung, da ihre chemische Zusammensetzung nicht bekannt ist und deshalb der von H. Braun aufgestellten Forderung bei der Zusammensetzung von Nährlösungen nicht genügt.

Die Anforderungen, die in obigen Ausführungen aufgestellt wurden, sind im wesentlichen in einer Nährlösung erfüllt, die von H. Braun und Goldschmidt für die Züchtung von Coli verwendet wurde. Durch geringe Modifikationen und durch Hinzufügung eines Reduktionsmittels erhalte ich folgende Lösung:

NaCl	5,00 g
KH_2PO_4	1,00 g
Na_2HPO_4	1,00 g
$MgCl_2$	0,25 g
Na_2S	1,00 g
Traubenzucker	5,00 g
Asparaginsaures Na	5,00 g
Aqua dest. ad	1000

Methodik.

Methoden sind vor allem von H. Braun beschrieben worden. Es kommt mir hier nur darauf an, auf einige Beobachtungen hinzuweisen, die mir während der Zubereitung der Nährlösungen und im Laufe des Ueberimpfens auffielen und die ich zum Teil als sehr wesentlich für das Gelingen der Züchtungsversuche erachte.

Ich verwende Natriumsulfid als Reduktionsmittel, da es im Gegensatz zu Cystein eine klare Lösung gab, was zur Beurteilung des Wachstums von Vorteil war. Magnesiumchlorid, Natriumsulfid und Traubenzucker sterilisierte ich fünfzehn Minuten im Wasserbade einzeln. Das übrige wurde anderthalb Stunden im Dampftopf sterilisiert. Nach Erkalten wurde alles zusammengegossen und der PH Wert bestimmt. Dabei möchte ich auf eine Bemerkung H. Brauns hinweisen, daß sich oft der PH Wert nach einiger Zeit ändert durch Aufnahme von Kohlensäure aus der Luft. Bei gutem Puffergemisch dürfte dieser Einfluß geringfügig sein. Doch ist eine leichte Schwankung des PH Wertes wohl immer bemerkbar. Es empfiehlt sich daher, die ganze Lösung nicht auf einmal in Reagenzgläser abzufüllen und die Wasser-

stoffionenkonzentration öfter nachzuprüfen. Nach Abfüllen in die Reagenzgläser wurden dieselben nochmals fünfzehn Minuten im Wasserbade erhitzt. Es hatte dies zu gleicher Zeit noch den Vorteil, daß der größte Teil des Luftsauerstoffs ausgetrieben wurde. Leider war dieses Verfahren nicht immer möglich, da ich später bei Anwesenheit von größeren Aminosäuregemischen oder gar bei Anwesenheit von Calziumchlorid und Schwermetallen starke Niederschläge bekam, die die Lösung unbrauchbar machten. Ich mußte dann von vornherein unter möglichst aseptischen Bedingungen arbeiten, sodaß nach dem Zusammengießen der einzelnen für sich sterilisierten Substanzen keine Erhitzung im Wasserbade mehr notwendig war. Dies hat allerdings den Nachteil, daß der Sauerstoffgehalt der Lösung ein größerer ist, da er ja nun nicht wie vorher durch Erhitzen der Röhrchen im Wasserbade ausgetrieben wird. Ferner ist hier eine besonders scharfe Kontrolle der Reinheit der Kulturen erforderlich.

Die sterilen Reagenzgläser füllte ich mit ca. 16 ccm Nährflüssigkeit, doch mußte ich oft eine kleinere Menge nehmen, wenn bei zu starker Gasbildung der Vaselinepfropf ausgetrieben wurde und dadurch die Gefahr der Verunreinigung gegeben war. Nach Beimpfen bedecke ich die Lösung mit einer ca. 1 cm hohen Vaselineschicht.

Das Ausgangsmaterial waren Stämme aus dem hiesigen Institut, die auf Tarozzi-Bouillon überimpft waren. Ich übertrug jedesmal 1 ccm der Kulturflüssigkeit. Dabei achtete ich besonders darauf, daß dies immer von einer Kultur geschah, die höchstens ein bis zwei Tage alt war. Ich hielt dies aus folgenden Gründen für wichtig: Die vegetativen Formen besonders des Bac. tetani und Bac. botulinus gehen in Tarozzi-Bouillon sehr schnell zu Grunde, und die Einsaat bestünde fast ausschließlich aus Sporen. Da nun nach Knight und Fildes die Reduktionsintensität, die für die Keimung der Sporen passend ist, für die Fortpflanzung vollkommen ungeeignet sein kann, so ist das Resultat auf jeden Fall ein ungünstiges. Entweder die Sporen keimen überhaupt nicht aus, falls sie es aber tun, so ist von vornherein die Wahrscheinlichkeit größer, daß eine Züchtung über Passagen nicht gelingt.

Nachdem die Lösung in den beimpften Reagenzgläsern mit einer Vaselineschicht überdeckt ist, werden dieselben in den Brutschrank gestellt und alle 24 Stunden angesehen. Ich überimpfte jedesmal pro Stamm drei Röhrchen. Es war überraschend, daß manchmal in einem oder zwei Röhrchen üppiges Wachstum eintrat, während der Rest ausblieb.

Das Wachstum wurde beurteilt: 1. nach dem Grade der Trübung und 2. nach dem Grade der Gasbildung. Ich unterscheide vier Grade der Trübung:

klar	—
schwach trüb	†
trüb	††
stark trüb	†††
sehr stark trüb	††††

Ebenfalls unterscheide ich vier Grade der Gasbildung:

keine Gasbildung	—
bis 0,5 cm Höhe der Gasbildung	†
bis 1,0 cm Höhe der Gasbildung	††
bis 1,5 cm Höhe der Gasbildung	†††
darüber	††††

Die Ueberimpfung von Passage zu Passage geschah mittels Kapillaren, die ich nach Erhitzen der Vaseline durch dieselbe hindurchstieß und dann das Kulturmedium ansaugte. Bei Uebertragung auf die nächste Passage ist zu beachten, daß man mit der Kapillare einige Centimeter in die Nährlösung eintaucht, da sich sonst die Kulturflüssigkeit als oberste Schicht im Reagenzglase ansammelt, was natürlich denkbar ungünstig für ein weiteres Wachstum ist, auf jeden Fall aber das Wachstum verzögert.

War sehr schwaches Wachstum eingetreten, so überimpfte ich anderthalb ccm der Kulturflüssigkeit. Man mag dagegen einwenden, daß dadurch Stoffe, die noch in geringen Mengen aus der Ausgangsbouillon herstammten, mit übertragen würden und nur dadurch weitere Passagen erzielt werden könnten. Dies ist aber sehr unwahrscheinlich. Falls diese Spuren das wesentliche für ein Wachstum waren, so müßten sie spätestens in der zweiten oder dritten Passage vollkommen verbraucht sein, da ja die Verdünnung bei 16 ccm Nährlösung sehr schnell hohe Grade erreicht. Auch wäre in einer höheren Lösung eine stärkere Trübung als in einer vorhergehenden ausgeschlossen. Dies war aber sehr oft der Fall. Es ist eher so zu verstehen wie auch schon van Loghem, H. Braun und C. E. Cahn-Bronner für Typhusbakterien erwähnten, daß es innerhalb desselben Stammes anspruchsvolle und anspruchslose Individuen gibt und daß bei geringer Einsaat die Menge der anspruchslosen zu klein ist.

In der Einleitung dieser Arbeit erwähnte ich noch von Hahn und Hirsch einige Versuche, die das Ausbleiben von Passagen dadurch erklärten, daß durch Säurebildung aus Traubenzucker bereits abgetötete Kulturen überimpft

werden. Um dies zu vermeiden überimpfte ich immer sofort nachdem ein einigermaßen deutliches Wachstum zur erkennen war. Kontrollen mit Kulturen, die schon vor zwei bis drei Tagen ein Wachstum gezeigt hatten, ließen allerdings diese Vorsichtsmaßregeln überflüssig erscheinen. Im Gegenteil zeigte sich oft hier eine Trübung der nächsten Passage in viel kürzerer Zeit.

Nach jeder Passage fertigte ich mikroskopische Präparate an, um ständig eine Kontrolle über die Reinheit der Kultur und über eventuelle Veränderung der Bakterienform zu haben.

Die Züchtungsversuche.

Zuerst prüfte ich das Wachstum der fünf von mir untersuchten Stämme in der bereits erwähnten Nährlösung. Diese führt die Bezeichnung Lösung A. Sie enthält also lediglich asparaginsaures Natrium als einzige Stickstoffquelle.

Es wurden folgende fünf Stämme geprüft:

1) B. tetani I
2) B. tetani II
3) B. botulinus
4) Pararauschbrand
5) Gasbrand Fraenkel

In Lösung A zeigte lediglich Bac. tetani I Wachstum über sechs Passagen. Die übrigen Stämme blieben schon in der 2. Passage aus. Der gewachsene Stamm wies aber im mikroskopischen Bild starke morphologische Abweichungen auf. Schon in der Ausgangsbouillon zeigte der junge Stamm größtenteils gram-negative Stäbchen und nur ganz vereinzelte Sporenbildung. In der vierten Passage erschienen einige Bazillen stark gebläht, teils der ganze Bazillenleib, teils mehr an einem Ende. Das mikroskopische Bild der sechsten Passage zeigt schlanke Stäbchen, das Protoplasma ist nicht gleichmäßig gefärbt sondern erscheint unterbrochen, sodaß man das Empfinden einer Querstreifung hat. Oft sind die einzelnen Organismen ellipsenförmig aufgetrieben und an einem Ende ist ein besonders stark gefärbter Punkt sichtbar. Die Stäbchen sind teilweise stark gekrümmt, oft so stark, daß sie am Ende eine Schlinge bilden und Sporenbildung vortäuschen. Sporen sind nur ganz vereinzelt zu sehen. Nach Ueberimpfung der 6. Passage in Tarozzibouillon und Züchtung des Stammes auf einer Fortnerplatte zeigen die Kulturen auch keine wesentliche Verbesserung. Es sind lediglich Stäbchen wieder häufiger grampositiv. Die mit diesem Stamm überimpfte Maus stirbt nicht, auch zeigt sie kein tetanisches Krankheitsbild.

Da dieser Wachstumserfolg also keineswegs befriedigend war, und auch bei Parallelversuchen im Institut mit dieser Lösung kein Wachstum erzielt wurde, besorgte ich mir einen zweiten Tetanus-Stamm, der, nachdem er auf alle seine Eigenschaften untersucht worden war, als absolut einwandfrei befunden wurde. Dieser Stamm zeigte kein Wachstum in Nährlösung A.

Bevor ich die nun folgenden Versuche beschreibe, muß ich noch auf eine neuere Arbeit von P. Fildes und G. M. Richardson eingehen, da die Untersuchungen dieser beiden Autoren richtunggebend für meine weiteren Versuche waren und ich deren Ergebnisse z. T. bei der Zusammensetzung der Nährlösung verwertete. Sie verwendeten folgende Aminosäuren bei der Zusammensetzung der Nährmedien:

s - Alanin		0,12 g
s - Valin		0,15 g
s - Leucin		0,17 g
s - Glyzin		0,20 g
l - Prolin		0,15 g
s - Serin		0,14 g
s - Asparagin		0,18 g
s - Methionin		0,07 g
l - Cystin		0,06 g
s - Phenylalanin		0,08 g
l - Tyrosin		0,05 g
l - Histidin HCl		0,05 g
l - Lysin 2HCl		0,09 g
d - Arginin HCl		0,05 g
l - Trytophan		0,02 g
Aqua dest. ad	1000	

Die Grundlösung war verschieden von der von mir angewandten. Vor allen Dingen enthielt sie das schon beschriebene „Sporogenes Vitamin".

Durch Variieren der Lösung stellten sie folgende Aminosäuren als unbedingt notwendig für ein Wachstum des B. sporogenes fest: Tryptophan, Leucin, Phenylalanin, Tyrosin und Arginin. Als wachstumfördernd nannten sie: Valin, Histidin, Cystin und Methionin.

Es war nun interessant zu untersuchen, ob die von mir untersuchten Stämme ein Wachstum ohne dieses Vitamin zeitigten und ob eventuell dieselben Aminosäuren sich als unbedingt notwendig erweisen würden. Zu diesem Zweck stellte ich drei Lösungen her.

1. Mit den für unbedingt notwendig erklärten Aminosäuren
2. Diese und die als wachstumfördernd bezeichneten Aminosäuren
3. Mit sämtlichen erwähnten Aminosäuren.

So erhielt ich folgende drei Lösungen.

Lösung B.

NaCl	5 g
KH_2Po_4	1 g
Na_2HPo_4	1 g
$MgCl_2$	0,25 g
Na_2S	1 g
Traubenzucker	5 g
Asparaginsaures Na	5 g
Tryptophan	0,06 g
Leucin	0,1 g
Phenylalanin	0,1 g
Tyrosin	0,06 g
Arginincarbonat	0,06 g
Aqua dest. ad	1000 g

Lösung C.

NaCl	5 g
KH_2PO_4	1 g
Na_2HPO_4	1 g
$MgCl_2$	0,25 g
Na_2S	1 g
Traubenzucker	5 g
Asparaginsaures Na	5 g
Tryptophan	0,08 g
Tyrosin	0,04 g
Phenylalanin	0,08 g
Leucin	0,1 g
Histidin	0,06 g
Valin	0,14 g
Cystin	0,02 g
Arginincarbonat	0,1 g
Aqua dest. ad	1000 g

Lösung D.

NaCl	5 g
KH_2PO_4	1 g
Na_2HPO_4	1 g
$MgCl_2$	0,25 g
Na_2S	1 g
Traubenzucker	5 g
Asparaginsaures Na	5 g

Tryptophan	0,04 g
Alanin	0,12 g
Valin	0,07 g
Leucin	0,1 g
Glycylglycin	0,2 g
Prolin	0,14 g
Serin	0,12 g
Cystin	0,02 g
Phenylalanin	0,08 g
Tyrosin	0,04 g
Histidin	0,06 g
Lysin 2 HCl	0,08 g
Arginincarbonat	0,04 g
Aqua dest. ad	1000 g

Ich prüfte zunächst sämtliche Stämme in Lösung B, und es wuchs hier der Bac. Fraenkel sehr üppig, während Pararauschbrand, Bac. tetani und Bac. botulinus kein Wachstum zeigten. Daraufhin variierte ich die Lösung, indem ich die verschiedenen Aminosäuren zuerst einzeln und auch dann einige zusammen wegließ. Die Grundlösung mit Asparaginsaurem Natrium als Hauptstickstoffquelle blieb unverändert, nur die fünf Aminosäuren Tryptophan, Phenylalanin, Leucin, Tyrosin und Arginincarbonat wurden auf ihre Notwendigkeit für das Wachstum geprüft.

Da ein Wachstum erfolgte bei alleiniger Anwesenheit von Tryptophan, versuchte ich dasselbe durch die chemisch ähnlich gebauten Aminosäuren Tyrosin oder Phenylalanin zu ersetzen. Dies mißlang aber. Brachte ich aber noch Leucin hinzu, so erfolgte wiederum ein Wachstum. Insgesamt wurde der Stamm in folgenden fünf Nährlösungen zu züchten versucht.

Lösung B_1: Grundlösung und Tryptophan
Lösung B_2: Grundlösung und Phenylalanin
Lösung B_3: Grundlösung und Tyrosin
Lösung B_4: Grundlösung, Leucin und Phenylalanin
Lösung B_5: Grundlösung, Leucin und Tyrosin

Dies ergab folgendes Ergebnis: Der von mir geprüfte Stamm von Bac. Fraenkel zeigte Wachstum bei alleiniger Anwesenheit von Asparaginsaurem Natrium und Tryptophan. Es war nicht möglich, das Tryptophan durch Phenylalanin oder Tyrosin zu ersetzen. Die Tatsache, daß ein Wachstum erfolgte, wenn nebenbei noch Leucin anwesend war, ist nicht zu erklären. Der Hauptunterschied der Aminosäuren Phenylalanin und Tyrosin gegenüber dem Tryptophan ist der, daß das letztere den Pyrrolring besitzt. In dem Leucin ist dieser

nicht enthalten und es ist auch nicht gut denkbar, daß durch Zugabe von Leucin der Bac. Fraenkel in Stande gesetzt worden ist, diesen zu synthetisieren. Welcher Faktor hier maßgebend war, ist also nicht ohne weiteres zu erkennen.

Es ist fernerhin noch bemerkenswert, daß in Nährlösung B, also in der Lösung, in der die meisten Aminosäuren sich befanden, geringste oder gar keine Gasbildung trotz stärkstem Wachstum stattfand, während sonst teilweise eine recht starke Gasentwicklung bemerkbar war. Es wäre durchaus denkbar, daß im ersteren Falle eine Bindung oder ein in Lösung gehen der durch das Bakterienwachstum entwickelten Gase stattgefunden hat. Einer besonderen Erwähnung verdient noch das ungemein rasche Wachstum, da es gelang, den Stamm in fünf bzw. sechs Tagen über sechs Passagen zu züchten (Näheres siehe Tabellen.).

Mikroskopisches Bild.

Die Ausgangsbouillon zeigte kurze, dicke, teils grampositiv, teils gramnegative Stäbchen, die manchmal fast Kugelform annahmen. Während der Passagen blieb das Bild ziemlich unverändert. Die Bazillen waren auch hier meist gramnegativ, nur in ganz jungen Kulturen waren etliche grampositiv.

Der Stamm war in der Ausgangsbouillon sowie auch nach Züchtung über sechs Passagen tierapathogen.

Nun prüfte ich die Stämme Pararauschbrand, Bac. botulinus und Bac. tetani in Lösung C und D. Es wuchsen hier der Bac. tetani und Bac. botulinus, während der Pararauschbrand in keiner der beiden Lösungen ein Wachstum zeigte. Doch konnte ich nur in verhältnismäßig langer Zeitspanne bis zur sechsten Passage gelangen:

In Lösung C	Bac. tetani	36 Tage
	Bac. botulinus	38 Tage
In Lösung D	Bac. tetani	27 Tage
	Bac. botulinus	29 Tage.

Dabei war folgende Beobachtung zu machen. Bei beiden Stämmen blieb die vierte Passage am längsten aus. In einem Fall acht Tage während dann die fünfte und sechste Passage in verhältnismäßig kurzer Zeit wuchsen. (48 bzw. 72 Std. Näheres siehe Tab.) Auch zeigten die letzten Passagen wieder stärkere Trübung. Ferner konnte die Beobachtung gemacht werden, daß die Bakterien eine gewisse „Inkubinationszeit“ brauchten. Tagelang zeigte sich nicht die Spur einer Trübung, besonders bei Bac. botulinus, sodaß schon an ein vollkommenes Ausbleiben des Wachstums gedacht wurde, um dann über Nacht ein starkes Wachstum zu zeitigen.

Mikroskopisches Bild des Bac. tetani II.

In der Ausgangsbouillon finden sich mittelgroße, grampositive Stäbchen größtenteils mit endständiger Spore. Während der Passagen zeigte sich nur geringe Sporenbildung, die einzelnen Bakterienleiber waren verkürzt, grampositiv und zum Teil stark aufgetrieben. Etliche Stäbchen waren stark gekrümmt, was so weit ging, daß Ringe gebildet wurden. Diese Veränderungen waren in Lösung C stärker ausgeprägt als in Lösung D, wesentliche Unterschiede waren aber nicht bemerkbar. Nach Einimpfen der sechsten Passage in Tarozzi-Bouillon regenerierte sich der Stamm weitgehend. Die oben beschriebenen Degenerationsformen verschwanden und es zeigte sich das typisch grampositive Stäbchen mit endständiger Spore.

Dieser Stamm war tierapathogen nach der sechsten Passage, während die Maus, die mit der Ausgangslösung geimpft worden war, unter typisch tetanischen Erscheinungen starb. Mit Bac. tetani II führte ich noch einen Kontrollversuch aus, indem ich ihn in einer 1 %igen Peptonlösung über sechs Passagen züchtete. Hier hatte er seine Toxinbildung nicht eingebüßt, die Maus starb in 48 Std. bei tetanischem Krankheitsbild.

Mikroskopisches Bild des Bac. botulinus.

Ausgangslösung zeigt kräftige grampositive Stäbchen mit reichlicher Sporenbildung. Während der Passagen werden die Stäbchen bedeutend schlanker, das Protoplasma erscheint weniger stark gefärbt. Wird das Präparat nicht sofort nachdem sich Wachstum gezeigt hat, angefertigt, so ist der größte Teil der Stäbchen gramnegativ. In der sechsten Passage finden sich stark verkleinerte, geschrumpfte Mikroorganismen, z. T. sind sie aber auch lang und fadenförmig ausgezogen. Auch hier sind die Veränderungen in Lösung C stärker als in Lösung D. Der Bac. botulinus erholt sich ebenfalls nach Einimpfen der sechsten Passage in Bouillon.

Die mit Zentrifugat der sechsten Passage überimpfte Maus stirbt nicht, während die mit 1 ccm der Ausgangslösung beimpfte Maus nach 24 Std. starb.

Wir sehen aus obigem Versuch, aus der Beobachtung des mikroskopischen Bildes, dem Verhalten beim Wachstum über die einzelnen Passagen und der Prüfung des Stammes auf Giftbildung am Tier, daß es wohl möglich war in Lösung C und D Bac. tetani und Bac. botulinus zu züchten, daß aber diese Nährmedien noch keineswegs den Erfordernissen entsprechen, die man an einen Nährboden stellen muß, wenn man einen Bakterienstamm unverändert erhalten will.

Beim Verfolgen der einzelnen Passagen war zu bemerken, daß die erste und zweite Passage am schnellsten gewachsen waren. Es ist dies wohl so zu erklären, daß der Stamm hier noch eine hohe Vitalität besaß, zum Teil aber auch mögen die Spuren von Sustanzen, die noch aus der Ausgangslösung herstammten, dieses raschere Wachstum begünstigt haben. — Daß das letztere eine Rolle spielt, dürfte als bewiesen gelten, denn in der ersten und zweiten Passage wachsen alle Stämme fast ausnahmslos in beinahe sämtlichen synthetischen Nährlösungen. — Nach der zweiten Passage etwa kommt der kritische Punkt, wo sich entscheidet, ob der Mikroorganismus in seinen Lebensäußerungen so stark geschädigt ist, daß er abstirbt oder aber im Stande ist, bei den gegebenen Ernährungsbedingungen ein Leben, sei es auch nur ein kümmerliches, weiterhin zu unterhalten. So erklärt sich denn die Tatsache, daß die dritte und vierte Passage gewöhnlich sehr lange ausblieben, weil hier wohl manche Substanzen fehlen, die das Bakterium gewohnt war zum Aufbau seines Protoplasmas zu verwenden. Soll nun weiterhin ein Wachstum stattfinden, so müssen diese Substanzen zum notdürftigen Leben entweder entbehrlich sein, oder aber der Mikroorganismus muß im Stande sein, diese Substanzen aus solchen aufzubauen, die in den einfachen Nährlösungen enthalten sind.

Bei Betrachtung des mikroskopischen Bildes fiel die Unregelmäßigkeit der Form der einzelnen Bazillenleiber auf. Teils verkürzt, teils gebläht, aber auch manchmal lang und fadenförmig. Ich halte es für unmöglich, daß diese verschiedenartigen Erscheinungsformen nur auf e i n e Ursache zurückzuführen sind, etwa die Quellungserscheinung auf ein Mißverhältnis zwischen osmotischem Druck der Nährlösung und dem des Bakterienprotoplasmas. — Zumal ja der osmotische Druck bei der Herstellung der Nährmedien berücksichtigt worden war. — Für viel wahrscheinlicher halte ich es, daß alle diese Erscheinungsformen eine Reaktion auf die veränderte Umwelt, d. h. im besonderen die erschwerten Ernährungsbedingungen zurückzuführen sind, und man könnte sich vorstellen, daß bei Züchtung über viele Passagen nur eine einzige dieser Formen sich erhält, eben die, die für diese betreffende Nährlösung am günstigsten ist. Einige bestimmt definierte Faktoren für all diese Veränderungen zu finden, bedarf natürlich genauerer Untersuchung.

Weiterhin fiel auf, daß die Kulturen sehr rasch ihre Färbbarkeit nach Gram verloren. Es ist bekannt, daß ältere Kulturen immer größtenteils gramnegativ sind. Daß hier so ein ungemein schneller Verlust der grampositiven Färbbarkeit ein-

trat dürfte wohl auf der Anwesenheit von Traubenzucker und dessen Spaltungsprodukte und der dadurch bedingten Säuerung des Nährmediums beruhen.

Wir hatten gesehen, daß Bac. tetani und Bac. botulinus nach Ueberimpfung der sechsten Passage in Tarozzi-Bouillon sich weitgehend regenerierten, was ihr Aussehen, ihre morphologische Gestaltung, anbelangten. Beide Stämme hatten aber ihre Giftbildung vollkommen eingebüßt und auch, nachdem sich die Stämme morphologisch in der Tarozzi-Bouillon erholt hatten, war die Toxinbildung nicht wieder zurückgekehrt. Es geht daraus hervor, daß die Züchtung in diesen synthetischen Nährlösungen doch einen sehr starken Einfluß auf die Lebensfunktion dieser beiden Anaerobier ausgeübt hat. Was das entscheidende Moment für das Ausbleiben der Toxinbildung war, ist nicht klar zu ersehen, ob dazu unbedingt höhere Eiweißkörper vorhanden sein müssen, oder ob vielleicht einige in den Lösungen noch nicht vorhandene Bausteine dazu imstande sind, die Toxinbildung anzuregen, bleibt dahingestellt. Auch an andere Tatsachen ist noch zu denken, z. B. höhere Konzentration der Nährstoffe, Zugabe von Schwermetallen oder anderen Elementen in geringer Konzentration und die Herstellung günstiger Redoxsysteme.

Frouin und Guillaume stellten bei der Züchtung von Tuberkelbazillen fest, daß sie mit steigenden Mengen von Asparagin den Ertrag steigern konnten. Es lag auf der Hand ähnliches zu versuchen. Als wichtigste Stickstoffquelle war bisher Asparaginsaures Natrium in meinen Nährlösungen. Ich fügte nun noch die gleiche Menge Glutaminsaures Natrium hinzu. Zu gleicher Zeit gab ich noch etwas Calziumchlorid hinzu, die Kochsalzkonzentration verminderte ich und fügte die entsprechende Menge Ammoniumchlorid dafür hinzu. Sonst entspricht diese Lösung der Lösung C. Es ergab folgende Lösung:

Lösung E

NH_4Cl	3 g
$NaCl$	2 g
KH_2PO_4	1 g
Na_2HPO_4	1 g
$MgCl_2$	0,25 g
$CaCl_2$	0,25 g
Na_2S	1 g
Traubenzucker	5 g
Asparaginsaures Na	5 g
Glutaminsaures Na	5 g
Tryptophan	0,08 g

Tyrosin	0,04 g
Phenylalanin	0,08 g
Leucin	0,1 g
Histidin	0,06 g
Valin	0,14 g
Cystin	0,02 g
Arginincarbonat	0,1 g
Aqua dest. ad	1000 g

In der Tat war in dieser Lösung ein besseres Wachstum zu erzielen. Es gelang den Bac. tetani in 21 und den Bac. botulinus in 23 Tagen über sechs Passagen zu züchten. Auch die Trübung war etwas stärker als in den vorhergehenden Nährlösungen. Doch zeigte das mikroskopische Bild keine wesentliche Besserung gegenüber dem aus Lösung C und D.

Pararauschbrand wuchs auch in dieser Lösung nicht.

Wie schon eingangs erwähnt, sind in sämtlichen Nährlösungen Spuren von fast allen Elementen durch Verunreinigung vorhanden. Trotzdem war an die Möglichkeit zu denken, durch Hinzufügen von Eisen einen günstigen Einfluß auf das Wachstum der Bakterien auszuüben, da ja durch die Arbeiten Warburgs die Wichtigkeit des Eisens für die biologischen Oxydationsprozesse bewiesen wurden. Ich ließ Nährlösung E vollkommen unverändert und brachte lediglich 0,002 Eisenzitrat hinzu. Dies erwies sich aber keineswegs als vorteilhaft. Bac. tetani wuchs äußerst spärlich in 25 Tagen über sechs Passagen während Bac. botulinus in der vierten Passage ausblieb.

Aus den beiden letzten Versuchen ersehen wir, daß eine Erhöhung der Stickstoffquellen einen günstigen Einfluß auf das Wachstum von Bac. tetani und Bac. botulinus ausübte. Doch beschränkte sich diese Besserung lediglich auf die Zeit, die notwendig war, um über sechs Passagen zu gelangen. Die morphologische Gestaltung, Toxinbildung und Sporenbildung war keineswegs gebessert. Es ist überhaupt eine eigentümliche Erscheinung, daß die Sporenbildung in den künstlichen Nährmedien äußerst gering, wenn nicht ganz verschwunden ist, während die Bazillen sofort nach Ueberimpfung in Tarozzibouillon wieder reichliche Sporenbildung zeigten. Eingangs erwähnte ich eine Arbeit von Knight und Fildes, die fanden, daß eine für die Fortpflanzung von Bakterien geeignete Reduktionsintensität für die Keimung von Sporen ungeeignet sein kann. Es ist möglich, daß ähnliche Bedingungen für die Bildung von Sporen bestehen. Da aber in den gewöhnlichen Nährmedien, z. B. Tarozzi-Bouillon, Bac. botulinus und Bac. tetani immer Sporen bilden, so müßte

man demnach hier annehmen, daß durch das Wachstum der Bazillen und die Bildung von Abbauprodukten die Reduktionsintensität so geändert würde, daß dann Sporenbildung eintritt und daß diese Aenderung der Reduktionsintensität in den synthetischen Nährlösungen nicht im genügenden Maße stattfindet.

Meine Ansicht ist folgende: Sporen sind die Dauerformen der einzelnen Bazillenstämme, sie sollen eine Erhaltung der Art gewährleisten. In meinen obigen Betrachtungen erwähnte ich, daß ich das Auftreten aller Degenerationserscheinungen für eine Störung der Vitalität der einzelnen Bazillenstämme halte. Daß diese stark geschwächten Mikroorganismen, die noch grade imstande sind, ihren Bestand zu fristen, fähig sind Dauerformen zu bilden, ist äußerst unwahrscheinlich. (Hierzu steht nicht im Widerspruch die besonders stark auftretende Sporenbildung eines noch hoch lebensfähigen Stammes bei plötzlich auftretenden verschlechterten Lebensbedingungen).

Die Hinzugabe von Eisencitrat zu der Nährlösung hatte keinen fördernden Einfluß. Im Gegenteil war bei Bac. botulinus eine deutliche Wachstumshemmung zu bemerken, auch Bac. tetani zeigte ein schwächeres und stark verzögertes Wachstum. Es entspricht dies ganz den Ergebnissen von Frouin und Guillaume, die bei Untersuchungen mit Tb-Bazillen fanden, daß Eisen beschleunigend wirkt bei saurer Reaktion des Nährmediums, die Wirkung aber mit steigender Stickstoffkonzentration schwächer wird und vollkommen in neutralen oder Traubenzuckernährböden verschwindet.

Im Anfange dieser Arbeit wies ich schon auf die Bedeutung des Redoxpotentials für das Wachstum der Anaerobier hin und bemerkte auch später noch einmal, daß ich es für einen der Faktoren halte, die zu einer Förderung und zu einem weniger von der Norm abweichenden Wachstum der Bazillen eventuell von Bedeutung sein könnten.

Auf Anregung von O. Ehrismann beschäftigte ich mich näher mit dem Vitamin C, das durch seine Eigenschaft befähigt sein dürfte, hier eine gewichtige Rolle zu spielen.

Zunächst einige Vorbemerkungen über die Eigenschaften des Vitamin C (H. Ohle 1936). Vitamin C oder l-Ascorbinsäure ist eine den Zuckern nahestehende Hexuronsäure, sie reagiert stark sauer, was durch die Endiol-Gruppe $\begin{matrix}-C=C-\\ OH\ \ OH\end{matrix}$ bedingt wird. Auf dieser Gruppe beruht auch das charakteristische Reduktionsvermögen der l-Ascorbinsäure. Die nicht besonders gereinigte l-Ascorbinsäure ist sehr empfindlich ge-

gen den Luftsauerstoff, besonders stark in neutraler oder alkalischer Lösung, und zwar ist zu dieser Autoxydation die Anwesenheit von Schwermetallen erforderlich, die dabei als Katalysatoren wirken. Ist die l-Ascorbinsäure von allen Metallen sorgfältig gereinigt und in destilliertem Wasser gelöst, wie auch in Quarzgefäßen aufbewahrt, so ist sie selbst gegen reinen Sauerstoff beständig. Es war bei meinen Versuchen natürlich unmöglich unter solch ausgesuchten Bedingungen zu arbeiten, dies war auch gleichgültig, da durch die Anwesenheit von Verbindungen mit der SH-Gruppe die Wirkung der Schwermetalle wieder aufgehoben wird. Nach Ohle dürfte die Beständigkeit der l-Ascorbinsäure in tierischen oder pflanzlichen Geweben auf dieser letzteren Tatsache beruhen. Ueber die Bestimmung des genauen Reoxpotentials wurden Versuche von K. Laki ausgeführt. Nach Ohle wurden genaue und zuverlässige Ergebnisse dadurch nicht erzielt.

Ich verwende für meine weiteren Versuche eine Lösung, die vollkommen mit der Lösung E übereinstimmt, nur enthält sie noch zusätzlich 1 g Ascorbinsäure.

Nährlösung F

NH_4Cl	3 g
NaCl	2 g
KH_2PO_4	1 g
Na_2HPO_4	1 g
$MgCl_2$	0,25 g
$CaCl_2$	0,25 g
Na_2S	1 g
Traubenzucker	5 g
Asparaginsaures Na	5 g
Glutaminsaures Na	5 g
Tyrosin	0,04 g
Tryptophan	0,08 g
Phenylalanin	0,08 g
Leucin	0,1 g
Histidin	0,06 g
Valin	0,14 g
Cystin	0,02 g
Arginincarbonat	0,1 g
l-Ascorbinsäure	1 g

Die Wachstumsergebnisse in Nährlösung F waren äußerst befriedigend. Bac. tetani und Bac. botulinus wuchsen in 13 Tagen über sechs Passagen. Dabei war ein ungeheuer gleichmäßiges Wachstum über sämtliche Passagen hinweg zu be-

merken. Das mikroskopische Bild zeigte bedeutend typischere Formen als in den Nährlösungen ohne l-Ascorbinsäure. Während der Passgaen war dauernd Sporenbildung nachzuweisen, auch fanden sich hier keine Fadenbildung und keine Quellungserscheinungen der einzelnen Bakterienleiber, wie dies oben bei den vorherigen Lösungen beschrieben wurde.

Die mit einem Zentrifugat der sechsten Passage des Bac. tetani überimpfte Maus starb nicht, dagegen starb die Maus, die mit 1 ccm der auf Tarozzi-Bouillon gebrachten sechsten Passage beimpft worden war nach 3 Tagen unter tetanischen Erscheinungen.

Bac. botulinus war tierapathogen.

Zum Schluß untersuchte ich noch die Entbehrlichkeit der einzelnen Aminosäuren. Ich modifizierte Lösung F und prüfte das Wachstum von Bac. tetani und Bac. botulinus in folgenden Lösungen:

Lösung F_1 : Lösung F ohne Arginincarbonat
Lösung F_2 : Lösung F ohne Valin
Lösung F_3 : Lösung F ohne Histidin
Lösung F_4 : Lösung F ohne Cystin
Lösung F_5 : Lösung F ohne Leucin
Lösung F_6 : Lösung F ohne Tyrosin
Lösung F_7 : Lösung F ohne Tryptophan
Lösung F_8 : Lösung F ohne Phenylalanin
Lösung F_9 : Lösung F ohne Asparaginsaures Na mit glutaminsaurem Na als Hauptstickstoffquelle

Baz. tetani zeigte nur Wachstum in Lösung F_2.

Baz. botulinus zeigte Wachstum in Lösung F_1, F_2, F_9.

Das mikroskopische Bild zu beschreiben erübrigt sich, da es keine wesentlichen Veränderungen gegenüber Lösung F zeigte. Leider verliefen sämtliche Tierversuche wieder negativ. Es ist wohl ausgeschlossen, daß das Weglassen der einzelnen Aminosäuren den Anlaß dazu gab, daß die Stämme apathogen wurden. Was hier eine ausschlaggebende Rolle spielte, ist mir unbekannt.

Zusammenfassung.

Die von mir untersuchten Stämme zeigten folgende Eigenschaften:

1.) Bac. tetani.

Es ist möglich, Bac. tetani in synthetischen Nährlösungen zu züchten ohne höhere Stickstoffquelle (Eiweiß, Pepto), mit alleiniger Anwesenheit einzelner Aminosäuren

als Stickstoffquelle. Und zwar sind folgende Aminosäuren für ein Wachstum unbedingt notwendig: Asparaginsaures Na, Tryptophan, Tyrosin, Phenylalanin, Leucin, Cystin, Arginin und Histidin. Die l-Ascorbinsäure übt einen fördernden Einfluß auf das Wachstum des Bac. tetani aus.

2.) Bac. botulinus.

Es ist möglich, Bac. botulinus in synthetischen Nährlösungen zu züchten ohne höhere Stickstoffquelle (Eiweiß, Pepton), mit alleiniger Anwesenheit einzelner Aminosäuren als Stickstoffquelle. Und zwar sind folgende Aminosäuren für ein Wachstum unbedingt notwendig: Tryptophan, Phenylalanin, Tyrosin, Cystin, und Histidin. Als Hauptstickstoffquelle befand sich in den Lösungen Asparaginsaures Na, dieses war durch Glutaminsaures Na zu ersetzen. Die l-Ascorbinsäure übt einen fördernden Einfluß auf das Wachstum des Bac. botulinus aus.

3.) Bac. Fraenkel.

Es ist möglich, Bac. Fraenkel in synthetischen Nährlösungen zu züchten ohne höhere Stickstoffquelle (Eiweiß, Pepton). Er zeigte Wachstum bei alleiniger Anwesenheit von Asparaginsaurem Na und Tryptophan als Stickstoffquelle. Tryptophan ist durch eine Kombination von Tyrosin und Leucin oder Phenylalanin und Leucin zu ersetzen.

4.) Pararauschbrand.

Pararauschbrand zeigt kein Wachstum in synthetischen Nährlösungen, die nicht eine höhere Stickstoffquelle enthalten (Pepton).

Für die gewachsenen Stämme gemeinsam gilt:

Die Züchtung in synthetischen Nährlösungen ist von starkem Einfluß auf die Lebensäußerungen der Bazillenstämme. Die Form der Mikroorganismen ist mehr oder minder degeneriert. Nach Einimpfen in Tarozzi-Bouillon erholen sich die Stämme regelmäßig. Die Fähigkeit, Toxine zu bilden, ist — bis auf den Fall des Bac. tetani in Lösung E — nach Züchtung über sechs Passagen verloren gegangen.

Bei der Beurteilung der vorliegenden Versuchsergebnisse ist vor allem zu bedenken, daß wir es hier nicht mit physikalischen oder chemischen Experimenten zu tun haben, deren Ablauf zum Schluß auf eine mathematische Formel zu bringen ist. Sondern es handelt sich hier um biologische Vorgänge, bei denen der Organismus, auch wenn er kein hochdifferen-

zierter ist, eine gewichtige Rolle mitspielt. Wir wissen, daß es nicht genügt, daß ein Krankheitserreger auf den Makroorganismus übertragen wird, um mit absoluter Sicherheit eine Krankheit auszulösen, sondern es müssen bestimmte Bedingungen erfüllt sein, die ein Wachstum der Bakterien ermöglichen und dann das typische Krankheitsbild hervorrufen können. Vom Bac. tetani z. B. wissen wir, daß er gerade in den Wundbuchten wächst, dort wo sich besonders viel zerquetschtes und zerfetztes Gewebe findet. Hier entstehen dan alle die Bedingungen zu seinem Wachstum. In den gebräuchlichen Nährböden hat man sich allen diesen Bedingungen, die zum Teil wissenschaftlich begründet, zum Teil durch die Empirie gefunden sind, möglichst weitgehend angepaßt. Aber schon in diesen Nährlösungen zeigen die einzelnen Bakterienstämme oft ein verschiedenes Verhalten. Das Nährmedium ist dasselbe geblieben und der Stamm geht trotz stärkster Einsaat oft nicht mehr an. Der Grund hierfür kann nur bei den Bakterienstämmen selbst liegen. Vielleicht ist es die zu bequeme Art der Fortpflanzungsbedingungen, die nicht mal durch schädliche Einflüsse unterbrochen werden, die ihrerseits einen stärkeren Anreiz zum Wachstum geben könnten. — Diese Annahme findet eine Bestätigung in der Tatsache, daß die Bakterienstämme meist üppig wachsen, wenn man sie ein oder zwei Passagen in sehr primitiven Nährlösungen gezüchtet hat und dann wieder in die Ausgangslösung zurücküberimpft. —

Diese Beobachtungen ergeben, daß es notwendig ist, beim Ausbleiben eines Wachstums, dies nicht ohne weiteres als Mißerfolg zu buchen, sondern erst durch Kontrollen eventuelle Fehlerquellen auszuschließen, wie z. B. die Ueberimpfung bereits abgetöteter Kulturen oder besonders wachstumsrefraktärer Stämme.

Bei den Nährlösungen mit l-Ascorbinsäure als Zusatz fiel das besonders gleichmäßige Wachstum und die verhältnismäßig gute Erhaltung der Form und Sporenbildung während der einzelnen Passagen auf. Bei den Anaerobiern, wo der Spaltstoffwechsel allein die ganze Energiequelle darstellt und derselbe von einer Konstanz des Oxydations-Reduktionspotenzials abhängig ist, dürfte die günstige Wirkung der l-Ascorbinsäure einzig allein darin liegen, daß durch sie eine Harmonie zwischen reduzierenden und oxydierenden Vorgängen hergestellt wird, die nahe an das Optimum für ein Anaerobenwachstum heranreicht. Es muß also die Herstellung eines günstigen Redoxsystems ausschlaggebend für ein Anaerobenwachstum angesehen werden.

Tabelle I. Bac. tetani II.

Lösung		I. Pass.	II.	III.	IV.	V:	VI:	Zeit für 6 Passagen
A	Trübung	†††	†	—	—	—	—	—
	Gasbildung	††††	††	—	—	—	—	
B		†††	††	—	—	—	—	—
		†††	††	†	—	—	—	
C		†††	††	†	†	†	†	36 Tage
		†††	††	††	†	††	††	
D		†††	††	††	†	†††	†††	27 Tage
		††††	†††	††	††	††	††	
E		†††	††	††	††	††	††	21 Tage
		††††	†††	†	†	††	††	

Tabelle II. Bac. botulinus.

Lösung		I. Pass.	II.	III.	IV.	V:	VI:	Zeit für 6 Passagen
A	Trübung	†††	†	—	—	—	—	—
	Gasbildung	†††	†	—	—	—	—	
B		†††	†	—	—	—	—	—
		†††	†	—	—	—	—	
C		†††	††	††	††	†	†	38 Tage
		†††	†††	†	†	†	†	
D		†††	††	††	††	†††	†††	29 Tage
		†††	††	††	††	††	††	
E		††††	††	†††	††	†††	†††	23 Tage
		†††	††	†	†	†	†	

Tabelle III. Bac. Fraenkel.

Lösung		I. Pass.	II.	III.	IV.	V:	VI:	Zeit für 6 Passagen
B	Trübung	††††	††††	††††	††††	††††	††††	5 Tage
	Gasbildung	†	—	—	—	—	—	
B_1		††††	††††	††††	††††	††††	††††	6 Tage
		†††	†††	†††	††	††	††	
B_2		—	—	—	—	—	—	—
		—	—	—	—	—	—	
B_3		—	—	—	—	—	—	—
		—	—	—	—	—	—	
B_4		††††	††††	††††	††††	††††	††††	6 Tage
		†††	††	†	†	†	†	
B_5		††††	††††	††††	††††	††††	††††	6 Tage
		†††	††	††	††	††	††	

Tabellarische Zusammenstellung der Notwendigkeit bezw. Entbehrlichkeit der einzelnen Aminosäuren bei Bac. tetani II und Bac. botulinus.

Tabelle IV. Bac. tetani II.

Lösung		I. Pass.	II.	III.	IV.	V:	VI:	Zeit für 6 Passagen
F	Trübung	†††	†††	††	††	††	††	13 Tage
	Gasbildung	†††	††	††	††	††	††	
F_1		†††	†	—	—	—	—	—
		††	†	—	—	—	—	
F_2		††	††	††	††	††	††	17 Tage
		††	††	††	††	††	††	
F_3		††	†	—	—	—	—	—
		†	—	—	—	—	—	
F_4		††	—	—	—	—	—	—
		†	—	—	—	—	—	
F_5		††	†	†	—	—	—	—
		††	†	—	—	—	—	
F_6		††	†	—	—	—	—	—
		†	—	—	—	—	—	
F_7		†	—	—	—	—	—	—
		—	—	—	—	—	—	
F_8		†††	††	††	†	—	—	—
		††	††	†	—	—	—	
F_9		††	††	†	†	†	—	5 Passagen
		††	†	†	†	—	—	in 24 Tagen

Tabelle V. Bac. botulinus.

Lösung		I. Pass.	II.	III.	IV.	V:	VI:	Zeit für 6 Passagen
F	Trübung	††††	††††	††	††	††	††	13 Tage
	Gasbildung	†††	††	†	†	†	†	
F_1		†††	††	††	††	††	††	14 Tage
		†††	††	†	†	†	†	
F_2		††††	†††	††	††	††	††	12 Tage
		††	††	†	†	†	†	
F_3		†††	†	—	—	—	—	—
		†	†	†	—	—	—	
F_4		††	†	—	—	—	—	—
		†	—	—	—	—	—	
F_5		††	—	—	—	—	—	—
		—	—	—	—	—	—	
F_6		††	††	†	—	—	—	—
		†	†	—	—	—	—	
F_7		†	—	—	—	—	—	—
		—	—	—	—	—	—	
F_8		††	†	—	—	—	—	—
		†	—	—	—	—	—	
F_9		†††	††	††	†	††	†	18 Tage
		†	†	†	†	†	†	

Anmerkung:

†	= schwache Trübung bzw. Gasbildung	bis	0,5 cm.
††	= Trübung	"	1,0 cm.
†††	= starke Trübung	"	1,5 cm.
††††	= sehr starke Trübung	"	darüber.

Herrn Prof. Dr. Zeiss danke ich nachträglich für die gütige Erlaubnis, die Arbeit im Hygienischen Institut anfertigen zu dürfen. Ferner danke ich Herrn Doz. Dr. Ehrismann für die Anregungen, die er mir vor und während der Anfertigung der Arbeit gegeben hat.

Literaturverzeichnis

Aubel: Z. f. angew. Chemie 43, 939: 1930.

Aubel, Aubertin, Genevois: C. r. Soz. Biol. 97, 1729; 1927.

Braun, H.: Abderhalden, Handb. d. biol. Arbeitsmethod. Urban und Schwarzenberg 1933. Zbl. f. Bakt. Orig. 122, 1.

Burrows, W.: Journ. Inf. Dis. 51, 298; 1932.

Ehrismann, O.: Z. f. Hyg. u. Inf. Bd. 118, 544: 1936.

Fildes and G. M. Richardson: Brit. journ. Exp. Pathol. 16, 326; 1935.

Fischer, A.: Zeitschr. f. Hyg. 35, 5; 1900.

Frouin u. Guillaume: s. Ref. v. H. Braun. Zbl. f. Bakt. Orig. 122, 23; 1932.

Gins, H. A.: Zbl. g. Bakt. Orig. 122, 48; 1932.

Gotschlich: Handb. d. path. Mikroorganismen v. Kolle, Kraus u. Uhlenhuth. 1, 33.

Hibler, v.: Zbl. f. Bakt. Orig. 122, 32; 1932.

Hosoya u. Kishino: Scient. Rep. Gov. Inst. Inf. Dis. 4, 123; 1925.

Knight, B. J. G. and Fildes: British journ. Exp. Path. 14, 112; 1933.

Mc. Leod u. Gordon: Bioch. journ. 18; 1924.

Loghem, van, Braun u. Cahn Bronner: s. Ref. v. H. Braun. Zbl. f. Bakt. Orig. 122, 9; 1932.

Michaelis, L.: Zeitschrift f. Immunitätsf. u. Exp. Therap. Orig. 32; 1921.

Ohle, H.: Oppenheimer, Handb. d. Bioch. Erg. Werk 3, 806; 1936.

Quastel, I. H. u. Stephenson, M.: Bioch. journ. 20, 1125; 1926.

Stickland, H.: Brit journ. Exp. Path. 28, 1746; 1934.

Ucke: Zbl. f. Bakt. Orig. 23, 996; 1898.

Vasarhelyi, I. v.: Zbl. f. Bakt. Orig. 131, 33; 1934.

Warburg, O.: Euler, Chemie d. Enzyme 2—3, 284; 1934.

Zeissler, I.: Handb. d. path. Mikroorg. v. Kolle, Kraus u. Uhlenhuth. 10, 35.

Zdansky, E.: Zbl. f. Bakt. 89, 1; 1923.

Lebenslauf

Am 20. Dez. 1911 wurde ich als Sohn des Kaufmanns Paul Höer zu Herrensohr-Saarbrücken geboren. Nach bestandener Reifeprüfung studierte ich in Heidelberg und Berlin Medizin. Vom 1. November 1934 bis 1. November 1935 unterbrach ich das Studium und diente während dieser Zeit bei der 8. Komp. I. R. 12 in Quedlinburg. Am 2. Juli 1937 bestand ich vor dem Prüfungsausschuß der Medizinischen Fakultät in Berlin das ärztliche Staatsexamen. Seit dieser Zeit bin ich bei der II. Inneren Abteilung des Horst-Wessel-Krankenhauses als Medizinalpraktikant tätig.